

# Nallonens kärleksliv

## Reproduktion och systematik hos björnbären

HILDE NYBOM

### 25 år senare

I april 1987 erhöj jag filosofie doktors-examen på en avhandling om björnbär: 'Apomixis in the genus *Rubus* and its effects on reproduction'. Detta var en tämligen svårsmält tegelsten om allt man nog egentligen inte ville veta om björnbärens reproduktion. I ett försök att popularisera mitt ämne, gav jag därför samtidigt ut en nedbantad version på svenska: 'Nallonens kärleksliv' (Svenska Uarda-akademiens ordbok, Lund 1983: **Nallon** (bot.) björnbär) (Fig. 1).

Idag, 25 år senare, har forskare inom botanik/genetik/ekologi fått tillgång till en serie fantastiska verktyg, baserade på olika typer av DNA-analyser. Verktyg som vi inte ens kunde drömma om för 25 år sedan... Detta faktablad behandlar en del av den forskning som bedrivits på björnbärens reproduktion och systematik de senaste 25 åren, både av mig och mina kollegor på Balsgård-SLU, och av andra forskare utomlands.

### Men först en presentation av våra nallon

Växtsläktet *Rubus* återfinns över nästan hela jordklotet. Här i Sverige kan vi glädja oss åt hallon, hjortron och åkerbär samt – främst eller åtminstone flest av dem alla – björnbären som inte är en art utan flera. I Sverige brukar vi räkna med 20–30 arter och då är vi fattigt lottade jämfört med resten av Europa, som beräknas ha 1000–2000 arter! Björnbären utgör ett eget undersläkte som heter *Rubus*, precis som 'huvud'-släktet. Andra stora undersläkten är *Idaeobatus* (dit hallonen hör) och *Malachobatus* (tropiska björnbär).

Inom undersläktet *Rubus* förekommer både diploida och polyploida arter. De förstnämnda har två uppsättningar kromosomer (precis som nästan alla djur samt ca två tredjedelar av växterna). Polyploida

arter har istället minst tre uppsättningar. Hos *Rubus* är grundtalet 7, vilket innebär att diploida arter har 14 kromosomer och tetraploida (det vanligaste för björnbär) har 28.

I Europa har vi ett fåtal diploida björnbärsarter, som växer främst i medelhavsområdet. Nästan alla europeiska björnbärsarter är istället polyploida. Detta innebär att de sätter frön utan föregående befruktning. Visserligen krävs det pollinering för att sätta fart på processen, och pollencellen växer ner genom blommans stift men den smälter aldrig samman med äggcellen. Avkomman till en apomiktisk planta blir därmed identisk med modern och vi får en klonbildning.

### Björnbär bildar stora kloner

Den första DNA-baserade studien av vildväxande björnbär utfördes 1989 i en population i Missouri, USA (Nybom och Schaal 1990). Jag gick 600 m på en liten väg och samlade in 40 bladprover från plantor av två olika arter, ett björnbär, *Rubus pensilvanicus* och ett hallon, *R. occidentalis*. Från dessa bladprover extraherade jag DNA, som hackades sönder i lagom stora bitar med ett restriktionsenzym. DNA-bitarna separerades efter storlek i ett elektriskt fält i en agarosgel (elektrofores). Därefter fördes hela detta 'mönster' av DNA-fragment över till ett nylonfilter (Southern blotting). Filtret hybridiserades med en kort DNA-sekvens från en bakteriofag, M13, som då fastnade på de fragment som hade en liknande sekvens. För att kunna se dessa hybridiserings-



Foto: Lars Törstensson, Elitplantstationen ([www.elitplantstationen.se](http://www.elitplantstationen.se))

ställen, hade vi märkt in M13-sekvensen med radioaktivt försör. Nylonfiltrets radioaktivitet fördes sedan över till en röntgenfilm. Hela denna process kallas RFLP (restriction fragment length polymorphism) och tog närmare två veckor från start till slut. Visserligen kunde man analysera ett 20-tal DNA-prov samtidigt men det var ändå en tidsödande och dyrbar metod.

Resultatet blev dock mycket intressant! Hallonproverna var olika utom i några få fall när plantorna hade växt bara en eller två meter från varandra (Fig. 2). Uppenbarligen hade dessa uppstått genom vegetativ förökning via rotskott. Annars var alla hallonplantor unika, precis som man väntar sig av en diploid, sexuell art. För björnbärs-

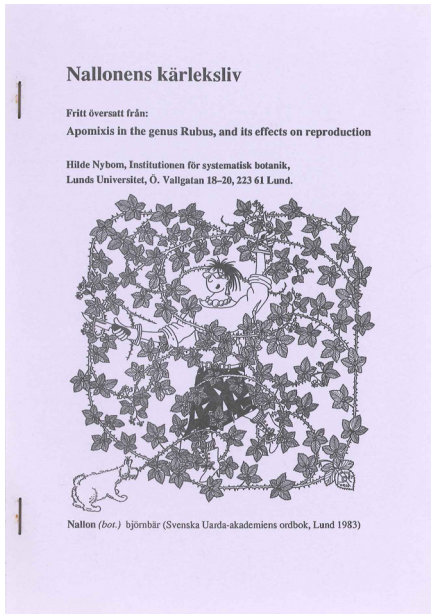


Fig. 1 Omslag till första utgåvan (1987) av 'Nallonens kärleksliv'.

plantorna hittade jag istället samma DNA profil hos betydligt fler plantor. Även plantor som växte flera hundra meter ifrån varandra var ibland identiska trots att de måste ha uppkommit genom fröförökning – precis som man väntar sig av en tetraploid, apomiktisk art (Fig. 3).

Motsvarande studie gjordes senare i Skåne, med skogsbjörnbär, *R. nessensis*, och vårt vanliga hallon, *R. idaeus* (Antonius och Nybom 1994). Nu hittade vi bara ett och samma DNA fingeravtryck hos alla björnbärsproverna medan samtliga hallonprov (insamlade med minst 6 m lucka) istället hade unika DNA fingeravtryck. Lite mer oväntat var det att sedan finna samma klon av *R. nessensis* på ett antal lokaler i Sverige, Danmark och Tyskland (Kraft m.fl. 1996, Nybom 1998). Även för flera andra björnbärsarter har samma kloner ibland hittats över stora geografiska områden i Nordeuropa (Kraft m.fl. 1995, 1996). Åter andra arter tycks istället innehålla flera olika kloner, och ibland kan man till och med hitta betydande genetisk variation inom en och samma lokal, som för *R. hirtus* i södra Polen (Gazda m.fl. 2007).

Sammanfattningsvis kan man konstatera att man å ena sidan kan hitta flera genetiskt olika individ (genotyper) av samma art på en lokal, och man kan å andra sidan hitta

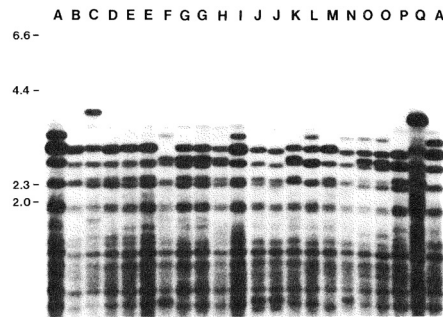


Fig. 2. DNA-fingeravtryck (RFLP + M13) för den diploida, sexuella arten *Rubus occidentalis* (svart hallon), olika bokstäver anger olika DNA-fingeravtryck hos plantor som samlats in längs en 600 m lång väg i Missouri, USA.

samma klon över stora geografiska områden. Ett mönster, som återfunnits även hos många andra apomiktiska arter (både djur och växter), är att det tycks finnas mer genetisk variation (fler arter, och/eller fler olika genotyper inom en art) i södra och mellersta delarna av Europa, och betydligt mindre variation i Nordeuropa. Fenomenet kallas 'geografisk partenogenes' (partenogenes = apomixis) och har inte ännu fått någon riktigt bra förklaring.

### Sex eller icke sex, det är frågan...

De flesta (alla?) björnbärsarter kan ibland bilda frön med vanlig befruktning. Vad det är som avgör ifall det blir en apomiktisk eller sexuell frösättning är dock inte känt, eller hur förmågan till apomixis nedärvs. För att ta reda på hur vanligt det är med sexuell frösättning i en annars apomiktisk art, pollinerade jag plantor av en art med pollen från en annan art, och utvärderade avkommorna med RFLP och M13-sekvensen (Nybom 1995). Det visade sig att cirka 10% av avkommorna hade uppkommit genom sexuell frösättning. När jag sedan pollinerade några av hybridplantorna med pollen från en tredje art, visade det sig att vissa hybridplantor hade förlorat förmågan till apomiktisk fröbildning; alla deras avkommeplantor skiljde sig nämligen åt, och hade dessutom ärvt några DNA-fragment från fadern. Andra hybrider hade istället bibehållit förmågan att bilda frön apomiktiskt. Om en sådan lyckas etablera sig i naturen och bildar en klon som drar till sig uppmärksamhet från en björnbärssystematiker – ja, då har vi

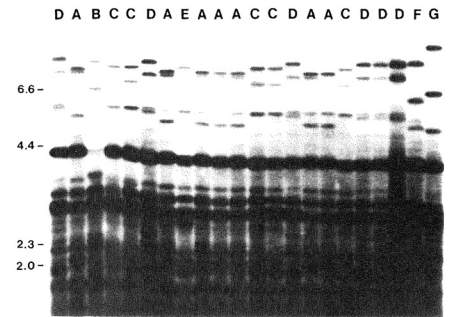


Fig. 3. DNA-fingeravtryck (RFLP + M13) för den tetraploida, apomiktiska björnbärsarten *Rubus pensilvanicus*, olika bokstäver anger olika DNA-fingeravtryck hos plantor som samlats in längs en 600 m lång väg i Missouri, USA.

nog en ny art! På detta sätt tycks till exempel *R. vestervicensis* ha blivit till (Kraft m.fl. 1995). Våra DNA-analyser visar att denna pentaploida art (har 35 kromosomer) troligen uppkommit genom att en oreducerad äggcell hos den triploida arten *R. grabowskii* (21 kromosomer) blivit pollinerad med den pentaploida arten *R. pedemontanus* (35 kromosomer, bildar sannolikt en del pollen med 14 kromosomer) (Fig. 4).

I senare experiment med björnbärsamlingen på Fredriksdals friluftsmuseum, utvärderades avkommorna med både RFLP och RAPD (random amplified polymorphic DNA). För RAPD används en kort, artificiellt framställd DNA-sekvens (primer) för att amplifiera (förmå) DNA-fragment från vissa ställen på kromosomerna. Dessa DNA-fragment storlekssorteras genom elektrofores och görs synliga med etidiumbromid och UV-ljus (Fig. 5). På så vis kan man framställa ett DNA-fingeravtryck på endast ett par dagar. Vi fann att högst 5% av de fröplantor som bildats efter fri pollinering av moderplantan, hade band från en annan art (Werlemark och Nybom 2003). Troligen hade alla de andra uppkommit genom apomixis eller möjligen genom självbefruktnings. När vi aktivt förde över pollen mellan olika arter, visade det sig istället att mellan 20 och 100% av avkommeplantorna bildats efter sexuell frösättning! Detta ganska oväntade resultat visar att främmande pollen troligen växer snabbare ner igenom pistillens stift, och därmed hinner nå en reducerad äggcell (halva kromosomtallet, uppkommit genom vanlig re-



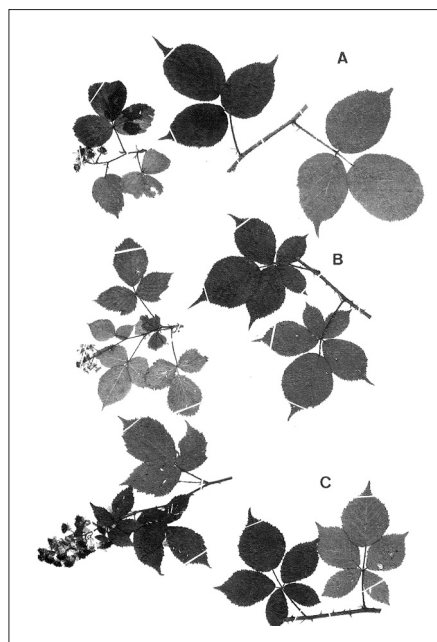


Fig. 4. Enligt DNA-baserad information har *Rubus vestervicensis* (B) troligen uppkommit genom hybridisering mellan *R. grabowskii* (C) och *R. pedemontanus* (A).

duktionsdelning, dvs meios) och befrukta denna. Artens/individens eget pollen växer troligen ner långsammare, och kommer inte fram förrän de reducerade äggcellerna redan konkurrerats ut av oducerade äggceller, som oftast utvecklas apomiktiskt.

### Hur förädlar man ett björnbär?

Många människor anser att björnbär tillhör det godaste man kan äta, och en anse- lig mängd björnbärssorter har tagits fram i moderna växtförädlingsprogram runt om i världen. Tyvärr är flertalet av dessa sorter ganska frostkänsliga, och hittills har därför bara ett fåtal odlats i Sverige, och då oftast bara i hemträdgårdar.

Precis som övriga bärslag, förökas odlade björnbär vegetativt (till exempel genom sticklingar eller rotskott), vilket innebär att alla plantor av en sort är identiska. När man istället analyserar plantor från olika sorter, finner man att de har helt olika DNA-fingeravtryck (Nybom m.fl. 1989, Nybom och Hall 1991). Härstamningen för dessa sorter kan undersökas genom en kvantifi- cering av antalet gemensamma DNA-mar- körer, liksom graden av släktskap mellan olika sorter och med vilda arter. Numera kan man även kontrollera sortäktheten i

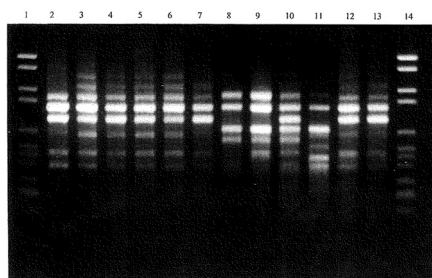


Fig. 5. DNA-fingeravtryck (RAPD, nr 1 och 14 är artificiella storleksmarkörer) för avkommor till en planta av den tetraploida apomiktiska björnbärsarten *Rubus infes- tus*; plantorna 8–12 har uppkommit ur en korsning med *R. vestitus* medan övriga uppkommit – troligen genom apomixis – efter fri avblomning.

livsmedelsprodukter som frusna bär, och till viss del även i puré fast då kan fröna (som innehåller DNA från pollinatörssor- ten) ställa till problem (Bassil m.fl. 2010).

Växtförädling baseras på att man kan korsa två olika föräldrar för att därefter selektera fram avkommeplantor med optimala egenskapskombinationer. Apo- mixis är ett allvarligt problem när en del av korsningarna producerar plantor som är identiska med sin mamma (Antonius och Nybom 1995)! Moderna björnbärs- sorter tycks emellertid nästan alltid bestå av komplexa arthybrider, ibland med inslag även av hallonarter. Hos dessa hybrider har förmågan till apomiktisk fröbildning ofta gått förlorad, och sorterna har alltså vanlig, sexuell frösättning. Således kan man nu- mera växtförädla björnbär precis som alla andra växtslag.

### Behovet av systematik

Ordning och reda ska det vara! Männis- kan har långt innan Linné försökt katalo- gisera och etikettera naturens mångfald. Men i vissa organismgrupper har det varit svårt att anpassa naturen till vårt mänskliga behov av ordning och reda. Detta gäller framför allt arter som förökar sig med en blandning av sexuella och asexuella me- toder. Den sexuella förökningen leder till uppkomst av en mängd olika kombination- er av egenskaper, dvs genetisk variation. Detta är i och för sig inget remarkabelt, nästa alla djur och flertalet växter förökar sig just så. Den asexuella förökningen leder emellertid till att det bildas 'öar' av lika-



Foto: Lars Törstensson, Elitplantstationen ([www.elitplantstationen.se](http://www.elitplantstationen.se))

dana växtindivider mitt i detta hav av olika egenskapskombinationer. Och då blir det väldigt frestande att urskilja olika enheter, som kanske kan beskrivas som separata ar- ter. Ett exempel är just björnbären, där nya arter kan uppstå genom hybridisering mel- lan andra arter. De många hybridisering- arna tillsammans med riklig klonbildning resulterar i en imponerande mångfald där det dessvärre saknas tydliga skiljelinjer som kan användas för artavgränsningar.

Ibland hittar man samma DNA-fing- eravtryck hos prov som bestämts till oli- ka arter, som exempelvis den svenska *R. scheutzii* och den tyska *R. muentarii* (Kraft och Nybom 1995).

Det verkar dock rimligt att kräva att olika arter ska ha olika DNA fingerav- tryck! Om det omvända förhållandet också ska gälla kan väl diskuteras. Olika DNA-fingeravtryck har tagits som bevis för att de lokalt förekommande krypbjörnbären *R. sordiosanthus* och *R. vikensis* ska be- handlas som egna arter, i stället för som former av den mera spridda och kända arten *R. wahlbergii* (Ryde 2010, Ryde och Werlemark 2010). Om alla genetiskt skilda plantor med förmåga till apomiktisk frö- sättning ska betraktas som unika arter – ja, då skulle vi nog behöva beskriva ytterligare några tusen björnbärsarter!

I ett försök att närma sig taxonomin från 'andra hållet', analyserades material insamlat från 20 europeiska populationer under det övergripande namnet *R. fruticosus* (Salvini m.fl. 2006). Eftersom målsättningen var att fokusera på de större, övergripande mönstren, valde man att analysera kloroplast-DNA, som är mera stabilt än cellkärnornas DNA (vilket analyserats i alla de andra här omnämnda undersökningarna). Mest variation hittade man som väntat i Mellaneuropa, där antalet beskrivna björnbärsarter är störst och mångfalden uppenbarligen rikast. Någon lösning på *Rubus*-systematiken har dock inte presenterats än, men någonting måste ju finnas kvar att göra under nästa 25-årsperiod.

## Referenser

- Antonius K, Nybom H (1994) DNA fingerprinting reveals significant amounts of genetic variation in a wild raspberry *Rubus idaeus* population. *Mol. Ecol.* 3: 177–180.
- Antonius K, Nybom H (1995) Discrimination between sexual recombination and apomixis/automixis in a *Rubus* plant breeding programme. *Hereditas* 123: 205–213.
- Bassil NV, Muminova M, Njuguna W (2010) Microsatellite-based fingerprinting of Western blackberries from plants, IQF berries and puree. *Acta Hort.* 859: 73–80.
- Gazda A, Szwagryk J, Nybom H, Werlemark G (2007) Morphological and genetic variability of *Rubus hirtus* (Waldst. & Kitt.) plants under partly open forest canopy. *Polish J. Ecol.* 55: 49–55.
- Kraft T, Nybom H (1995) DNA fingerprinting and biometry can solve some taxonomic problems in apomictic blackberries (*Rubus* subgen. *Rubus*). *Watsonia* 20: 331–345.
- Kraft T, Nybom H, Werlemark G (1995) *Rubus vestervicensis* (Rosaceae) – its hybrid origin revealed by DNA fingerprinting. *Nord. J. Bot.* 15: 237–242.
- Kraft T, Nybom H, Werlemark G (1996) DNA fingerprint variation in some apomictic blackberry species (*Rubus* subgen. *Rubus*, Rosaceae). *Pl. Syst. Evol.* 199: 93–108.
- Nybom H, Rogstad SH, Schaal BA (1989) DNA 'fingerprints' can distinguish cultivars of blackberries and raspberries. *Acta Hort.* 262: 305–310.
- Nybom H, Schaal BA (1990) DNA "fingerprints" reveal genotypic distributions in natural populations of blackberries and raspberries (*Rubus*, Rosaceae). *Amer. J. Bot.* 77: 883–888.
- Nybom H, Hall HK (1991) Minisatellite DNA 'fingerprints' can distinguish *Rubus* cultivars and estimate their degree of relatedness. *Euphytica* 53: 107–114.
- Nybom H (1995) Evaluation of interspecific crossing experiments in facultatively apomictic blackberries (*Rubus* subgen. *Rubus*) using DNA fingerprinting. *Hereditas* 122: 57–65.
- Nybom H (1998) Biometry and DNA fingerprinting detect limited genetic differentiation among populations of the apomictic blackberry *Rubus nessensis* (Rosaceae). *Nord. J. Bot.* 18: 323–333.
- Ryde U (2010) Genetic analysis shows that *Rubus vikensis* is a distinct species with a disjunct distribution. *Nord. J. Bot.* 28: 246–250.
- Ryde U, Werlemark G (2010) Steningebjörnbär, ett nygammalt krypbjörnbär från Halland. *Svensk Botanisk Tidskrift* 104(5): 405–413.
- Salvini D, Fineschi S, Pastorelli R, Sebastiani F, Vendramin GG (2006) Absence of geographic structure in European populations of *Rubus fruticosus* L. complex using chloroplast DNA microsatellites. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 131: 616–621.
- Werlemark G, Nybom H (2003) Pollen donor impact on progenies of pseudogamous blackberries (*Rubus* subgen. *Rubus*). *Euphytica* 133: 71–80.

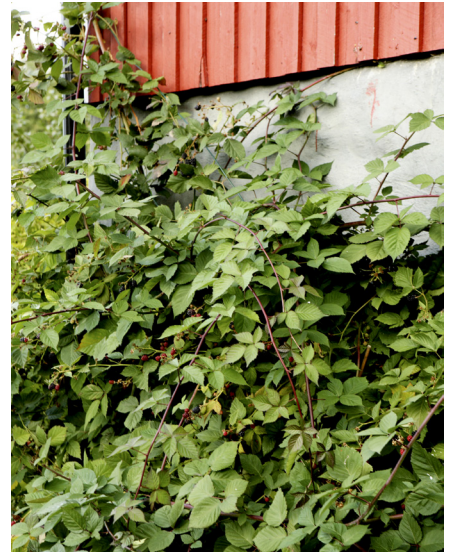


Foto: Lars Torstensson, Elitplantstationen ([www.elitplantstationen.se](http://www.elitplantstationen.se))

**Faktabladet är utarbetat inom  
LTJ-fakultetens område för Växtförädling och bioteknik, Balsgård  
[www.slu.se/balsgard](http://www.slu.se/balsgard)**

**Forskningsområdet omfattar flera olika projekt, som finansierats av bl a dåvarande forskningsråden  
NFR och SJFR, Enanderska fonden ([www.kva.se](http://www.kva.se)) och Lunds botaniska förening ([www.lundsbotaniska.se](http://www.lundsbotaniska.se)).**

**Projektansvarig Hilde Nybom, [hilde.nybom@slu.se](mailto:hilde.nybom@slu.se)**

**<http://epsilon.slu.se>**